Journal of Horticultural Science
Vol. 35, No.4, Winter 2022, P. 469-477
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰، ص. ۴۷۷-۴۶۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

مقاله پژوهشی

تعیین آللوتیپ ژن *S-RNase* و ناحیه پیشبر ژن *MdMYB10* در چند ژنوتیپ سیب (*Malus* spp.)

معصومه وکیلی قرطاول[۱] – ناصر مهنا[۲]*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۱

چکیده

سیب (*Malus* spp.) یکی از مهم‌ترین درختان میوه مناطق معتدله است. رنگ گوشت میوه سیب، از سفید تا قرمز متغیر است و تجمع مقدار بالایی از آنتوسیانین باعث قرمز بودن گوشت میوه آن می‌باشد، چنین افزایشی در مقدار آنتوسیانین در بسیاری از موارد به دلیل بیان بالای ژن *MdMYB10* در بسیاری از بافت‌ها از جمله گوشت میوه است، با این وجود، در مواردی، یک مکان ژنی پیوسته با آلل S_3 مکان ژنی *S-RNase*، به عنوان مسئول قرمزی گوشت میوه در بعضی از ژنوتیپ‌ها پیشنهاد شده است. برای بررسی سازوکار قرمز بودن رنگ گوشت میوه در برخی ژنوتیپ‌های محلی، استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگی بدست آمده از ۹ ژنوتیپ سیب با گوشت قرمز و گوشت سفید انجام شد و آللوتیپ آنها از نظر ناحیه پیشبری ژن *MdMYB10* و نیز وجود آلل S_3 در مکان ژنی *S-RNase* با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر با آغازگرهای اختصاصی هر ژن و الکتروفورز ژل آگارز قطعات تکثیر شده، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که ژنوتیپ‌های گوشت سفید در ناحیه پیشبری ژن *MdMYB10* فاقد آلل R_6 بوده و همگی هموزیگوت R_1R_1 تشخیص داده شدند. در حالی‌که، ارقام سیب گوشت قرمز دارای حداقل یک آلل R_6 در ناحیه پیشبری بوده و از نظر ژنوتیپ مکان ژنی خودناسازگاری *S-RNase*، آلل S_3 را دارا بودند. بنابراین، می‌توان نمونه‌های مذکور را هیبریدی از واریته 'Niedzwetzkyana' دانست. ممکن است گوشت قرمزی در یکی از ژنوتیپ‌های مورد بررسی که برای ناحیه پیشبری R_1R_1 بود، مربوط به مکان ژنی پیوسته با آلل S_3 مکان ژنی *S-RNase* باشد. استفاده از این ژنوتیپ‌های گوشت قرمز برای اصلاح میوه‌هایی با آنتوسیانین بالا توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، سیب گوشت قرمز، ناحیه پیشبری ژن *MdMYB10*، *S-RNase*

مقدمه

سیب گوشت قرمز (*Malus* spp.) یکی از ژنوتیپ‌های کمیاب سیب است که رنگ قرمز گوشت آن، بدلیل مقدار بالای آنتوسیانین در کورتکس می‌باشد و همین امر سبب تمایز آن از سیب‌های معمولی و ایجاد ظاهر جذاب آن شده است (۳۴). آنتوسیانین‌ها به عنوان گروه بسیار مهمی از فلاونوئیدها عامل ایجاد فنوتیپ رنگ قرمز در میوه سیب هستند. تجمع آنتوسیانین در گوشت میوه سیب، ویژگی جدیدی برای سیب در برنامه‌های اصلاح نژادی و قابلیت بازاریابی ایجاد می‌کند (۲۰). مطالعات اخیر نشان داده است که سیب‌های با رنگ قرمزتر دارای غلظت بیشتر آنتوسیانین هستند (۱۲). هم چنین، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و اهمیت آنتوسیانین‌های موجود در میوه‌های مختلف و سبزیجات برای سلامتی باعث شده که آنتوسیانین‌ها به عنوان دارو در بسیاری از کشورها پذیرفته شوند (۱۳ و ۱۴).

نوع، میزان و محتوای آنتوسیانین‌ها بسته به نوع آنزیم‌ها، ژن‌ها (ژن‌های بیوسنتزی و ژن‌های ساختاری)، عوامل رونویسی موثر بر مسیر بیوسنتز و شرایط محیطی متغیر می‌باشد (۵، ۸، ۹، ۱۱، ۲۲ و ۳۰). بیان هماهنگ این آنزیم‌ها بوسیله عامل رونویسی *MYB* کنترل می‌شود (۱ و ۲۱). عوامل رونویسی *MYB* حاوی یک تا سه واحد تکرار (*R1 –R2 –R3*) در دامنه‌ی متصل شونده به DNA (*R3MYB* با یک تکرار، *R2R3MYB* با دو تکرار و *R1R2R3MYB* با سه تکرار) می‌باشند (۱۶). عامل رونویسی R2R3MYB در بیوسنتز آنتوسیانین میوه سیب نقش دارد. مکان ژنی این عامل رونویسی، با

۱ و ۲- به‌ترتیب فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: mahna@tabrizu.ac.ir)
DOI: 10.22067/JHS.2021.60821.0

نام‌های مختلف *MYB1*، *MYBA* و *MYB10* نامگذاری شده است که به ترتیب مسئول رنگ قرمز پوست و گوشت میوه سیب هستند (۲، ۷ و ۳۱). بنابراین تغییرات اندک در بیان پروتئین های MYB روی فنوتیپ گیاه موثر است (۲۷).

بررسی آللوتیپ (تیپ یا نوع آلل‌های موجود در یک مکان ژنی در ژنوتیپ‌های یک جمعیت یا گروهی از ژنوتیپ‌ها) مکان‌های ژنی *S-RNase* و ناحیه پیشبر ژن *MdMYB10* در مطالعات متعددی بر روی سیب‌های با آنتوسیانین بالا بررسی شده است (۳، ۵، ۷ و ۳۳). ولی تا به حال در مورد ژنوتیپ‌های بومی موجود در ایران گزارشی در دست نیست. ناحیه پیشبر (راه‌انداز) ژن *MdMYB10* از نظر توالی نوکلئوتیدی دو نوع می‌باشد: در برخی از ژنوتیپ‌ها، یک ناحیه ریزماهواره‌ای ۲۳ جفت بازی، ۵ بار تکرار شده است (آلل R_6)؛ در حالی‌که در دیگر ژنوتیپ‌ها این توالی نوکلئوتیدی ریزماهواره‌ای وجود ندارد (آلل R_1). در اغلب موارد، آلل R_6 در سیب‌های گوشت قرمز مشتق از واریته 'Niedzwetzkyana' و خود این واریته وجود دارد که یک فرم طبیعی *Malus sieversii* بوده و بومی آسیای مرکزی است (۶). بر اساس نتایج بدست آمده از گزارش‌های قبلی، طول ناحیه پیشبری R_6 در ژن *MYB10* حدود ۴۹۶ جفت باز، طول ناحیه پیشبری R_1 در همان ژن حدود ۳۹۲ جفت باز (۶) و طول قطعه ژن S_3-*RNase* حدود ۵۰۰ جفت باز (۳) است.

در بررسی‌های اخیر بین بیوسنتز آنتوسیانین و سیستم خودناسازگاری در سیب پیوستگی دیده شده است. سیب دارای سیستم خودناسازگاری گامتوفیتی است که بوسیله یک مکان ژنی *S* چند آللی کنترل می‌شود (۱۰ و ۱۷). گلیکوپروتئین مادگی با فعالیت ریبونوکلئازی (*S-RNase*) که بوسیله مکان ژنی *S* رمزگذاری می‌شود با استفاده از روش مولکولی شناسایی شده است (۴) که باعث خودناسازگاری می‌شود (۲۴ و ۲۶). در سیستم خودناسازگاری گامتوفیتی رشد لوله گرده بوسیله یکسری آلل $S_1, S_2, S_3,\ldots, S_n$ کنترل می‌شود. بررسی‌ها نشان داده‌اند که حضور آلل S_3 در برخی واریته‌های سیب مثل Pink Pearl و JPP35 موجب بروز فنوتیپ گوشت قرمزی در میوه سیب شده است حتی تلاقی این گیاهان با سایر گیاهان باعث فنوتیپ رنگ قرمز گوشت میوه می‌باشد. با توجه به اینکه این آلل در بسیاری از ژنوتیپ‌ها باعث بیوسنتز آنتوسیانین نمی‌شود. بنابراین براساس گزارش‌های قبلی، یک مکان ژنی پیوسته با آلل S_3 موجب بیوسنتز آنتوسیانین در برخی سیب ها می‌شود (۲۸) که سازوکار مولکولی آن تا حد زیادی ناشناخته است.

سیب یک میوه تجاری با عمر پس از برداشت طولانی مدت می‌باشد و یکی از اهداف برنامه اصلاحی، معرفی سیب‌های گوشت قرمز در ارقام تجاری با کیفیت بالا است. توسعه ارقام با پتانسیل تجاری می‌تواند با استفاده از نشانگرها تسریع یابد. با توجه به اهمیت آلل S_3 مکان ژنی *S-RNase* و ناحیه پیشبری ژن *MdMYB10* در تنظیم مسیر بیوسنتز آنتوسیانین، این مطالعه به منظور شناسایی و تعیین آللوتیپ ژن *S-RNase* و ناحیه پیشبر ژن *MdMYB10* در ۹ ژنوتیپ سیب و برای اولین بار برای ژنوتیپ‌های بومی ورزقان، میاندوآب، خلعت پوشان، ایوند و یک نمونه کشت بافتی از ژنوتیپ دیگری از میاندوآب انجام گردید.

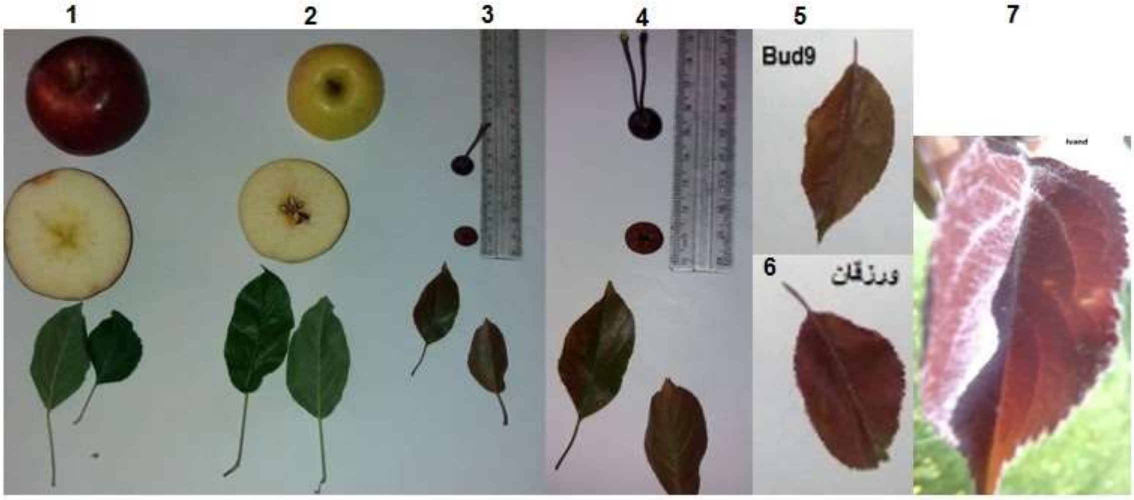
مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: نمونه‌های برگی جوان کاملا توسعه یافته از ژنوتیپ‌های گوشت سفید، مانند Red Delicious، Granny Smith، Golden Delicious (نهالستان آقای حسین تقی‌زاده واقع در شهر آذرشهر) و سیب‌های محلی گوشت قرمز مناطق میاندوآب (سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی شهید باکری میاندوآب)، ورزقان، گوشت قرمز Bud9 و ماکامیک (ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشگاه تبریز) و یک نمونه کشت بافتی (موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی دانشگاه تبریز) از درخت دیگری از سیب محلی میاندوآب و یک سیب محلی با شاخه و برگ قرمز از باغات ایوند (نزدیک تبریز) تهیه و در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱- صفات مورفولوژیکی ژنوتیپ های سیب مورد استفاده در این تحقیق

Table 1- Morphological traits (color) of *Malus* genotypes used in this study

Genotype ژنوتیپ / Color رنگ	*In vitro* sample نمونه درون شیشه‌ای	Granny Smith گرانی اسمیت	Red Delicious رد دلیشز	Golden Delicious گلدن دلیشز	Bud9 باد۹	Miandoab میاندوآب	Varzighan ورزقان	Khalat-poushan خلعت پوشان	Ivand ایوند
Fruit flesh گوشت میوه	Unknown نامعلوم	White سفید	White سفید	White سفید	Red قرمز	Red قرمز	Red قرمز	Red قرمز	Red قرمز
Fruit skin پوست میوه	Unknown نامعلوم	Green سبز	Red قرمز	Yellow زرد	Red قرمز	Red قرمز	Red قرمز	Red قرمز	Red قرمز
Shoot شاخساره	Red قرمز	Green سبز	Green سبز	Green سبز	Red قرمز	Red قرمز	Red قرمز	Red قرمز	Red قرمز



شکل ۱- نمونه‌های برگ و میوه ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق. ۱) رد دلیشز، ۲) گلدن دلیشز، ۳) میاندوآب، ۴) ماکامیک، ۵) Bud9، ۶) ورزقان و ۷) ایوند

Figure 1- Leaf and fruit samples of the genotypes used in this research. 1) Red Delicious, 2) Golden Delicious, 3) Miandoab, 4) Makamik (Khalatpoushan), 5) Bud9, 6) Varzighan, and 7) Ivand



شکل ۲- تصویری از درختان بعضی از ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق. ۱) میاندوآب، ۲) ماکامیک، ۳) ورزقان، ۴) Bud9

Figure 2- The pictures of the genotype trees used in this research. 1) Miandoab, 2) Makamik (Khalatpoushan), 3) Varzighan and 4) Bud9

تکثیر ناحیه پیشبر ژن *MdMYB10* بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

برای استفاده از توالی تکراری ریزماهواره که چند شکلی بالایی دارند بطور معمول از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) استفاده می‌شود. برای استخراج DNA ژنومی از بافر CTAB دو درصد و از نمونه‌های برگی جوان کاملا توسعه یافته و براساس روش لودهی و همکاران (۱۹) استفاده شد. برای تکثیر ناحیه پیشبر ژن *MdMYB10* از آغازگر مستقیم 5'-GGAGGGGAATGAAGAAGAGG-3' و آغازگر معکوس 5'-TCCACAGAAGCAAACACTGAC-3' و شرایط PCR ارائه شده توسط اسپلی و همکاران (۶) و فان ناکر و همکاران (۳۳) استفاده شد و با استفاده از ابزار BLAST در سایت NCBI و نرم‌افزار Oligo 7.0 صحت توالی آغازگرها تایید گردید.

تکثیر آلل S_3-RNase بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

DNA کل استخراج گردیده با استفاده از آغازگر مستقیم -´5 CAAACGATAACAAATCTTAC-3′ و آغازگر معکوس -´5 TATATGGAAATCACCATTCG-3′ و با شرایط PCR ی بروثرت (۳) و سکیده و همکاران (۲۸) برای تعیین آلل *S_3-RNase* تکثیر گردید. سپس قطعات تکثیر شده توسط الکتروفورز ژل آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند.

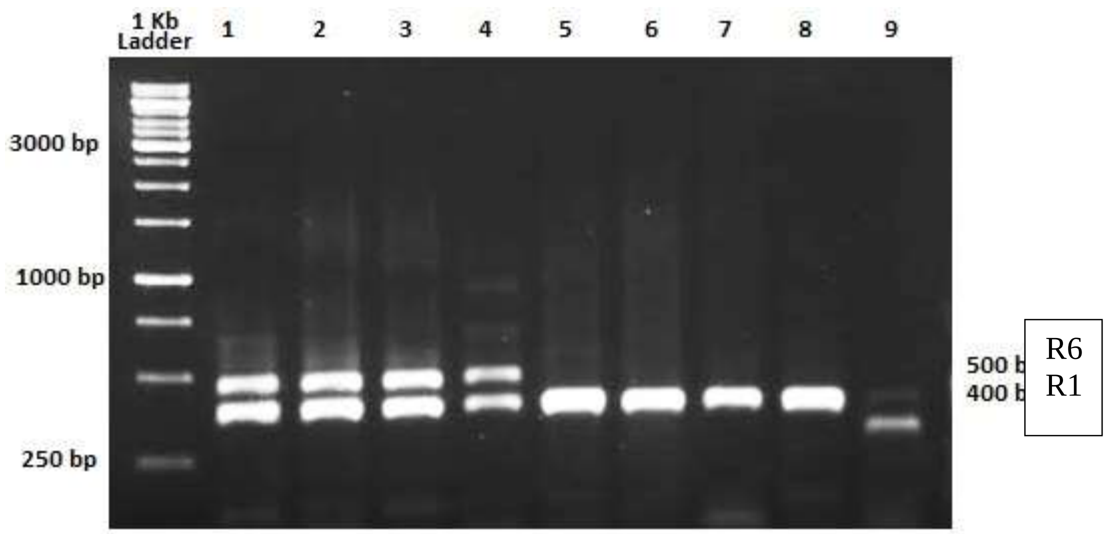
شناسایی آلل‌های ناحیه پیشبر فرادست ژن *MdMYB10* و آلل *S_3-RNase*

بر اساس نتایج بدست آمده از گزارش‌های قبلی، طول ناحیه پروموتری پیشبری R_6 در ژن *MYB10* حدود ۴۹۶ جفت باز، طول ناحیه پروموتری پیشبری R_1 در همان ژن حدود ۳۹۲ جفت باز (۶) و طول قطعه آلل *S_3-RNase* حدود ۵۰۰ جفت باز (۳) است که ملاک شناسایی آلل‌ها در این تحقیق قرار گرفتند.

نتایج و بحث

تکثیر ناحیه پیشبری ژن *MdMYB10*

الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز حاصل از هفت بار تکرار برای ۹ ژنوتیپ از گیاهان بومی و تجاری با آغازگرهای اختصاصی ناحیه پیشبری ژن *MdMYB10* (شکل ۳)، برای نمونه‌های Bud9، خلعت پوشان، ورزقان و میاندوآب دو باند که یکی در محدوده ۵۰۰ و دیگری در محدوده ۴۰۰ جفت بازی و برای نمونه‌های Golden Delicious، Granny Smith، Red Delicious و گیاهچه‌های کشت بافتی موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی فقط یک باند در محدوده ۴۰۰ جفت بازی را نشان داد. با این‌که نمونه ایوند هم دو باند نشان داد ولی این باندها، یکی در محدوده ۴۰۰ و دیگری با طولی بین باندهای ۴۰۰ و ۲۵۰ جفت باز مشاهده شد (شکل ۳). با توجه به نتیجه بدست آمده، ژنوتیپ‌های Bud9، خلعت پوشان، ورزقان، میاندوآب هتروزیگوت و ژنوتیپ‌های Golden Delicious، Granny Smith، Red Delicious و گیاهچه‌های کشت بافتی هموزیگوت بودند (شکل ۳). بدین توضیح که سیب‌های با آنتوسیانین بالا در میوه دارای حداقل یک آلل R_6 در ناحیه پیشبری ژن *MdMYB10* بودند. این نتیجه با مشاهدات فان ناکر و همکاران (۳۳) مطابقت داشت. ژنوتیپ نمونه کشت بافتی R_1R_1 بود. در حالی‌که انتظار می‌رفت این ژنوتیپ نیز دارای حداقل یک آلل R_6 باشد چون گیاه مادری این نمونه درون شیشه‌ای حاوی شاخ و برگ و میوه گوشت قرمز بود، به‌نظر می‌رسد گوشت قرمزی در این نمونه مربوط به مکان ژنی پیوسته با آلل S_3- *RNase* باشد.



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR تکثیر ناحیه پیشبری ژن MdMYB10 در ژنوتیپ‌های سیب بر روی ژل آگارز یک درصد؛ از چپ به راست: Ladder O'Gene .Ruler™ (1 Kb DNA Ladder) (Fermentas) ۱) Bud9 (کنترل مثبت برای R_6)؛ ۲) ورزقان؛ ۳) میاندوآب؛ ۴) ماکامیک (خلعت پوشان)؛ ۵) Golden Delicious؛ ۶) Granny Smith (کنترل برای R_1R_1)؛ ۷) نمونه کشت بافتی؛ ۸) Red Delicious؛ ۹) ایوند

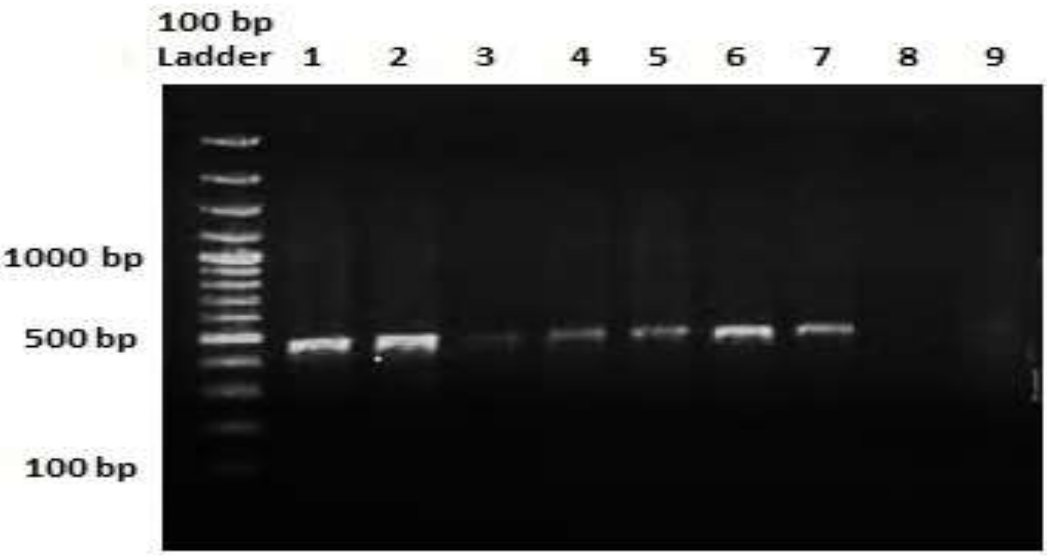
Figure 3- Electrophoresis of PCR products of amplification of the *MdMYB10* Promoter Region from apple genotypes on 1 % agarose gel. From the left to the right: Ladder (O' Gene Ruler ™ 1 Kb DNA Ladder) (Fermentas). 1) Bud9 (positive control for R_6), 2) Varzighan, 3) Miandoab, 4) Makamik (Khalatpoushan), 5) Golden Delicious, 6) Granny Smith (control for R_1R_1), 7) sample of tissue culture, 8) Red Delicious, 9) Ivand.

الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* در مطالعه اسپلی (۶) و همکاران و لین وانگ و همکاران (۱۸) برای Granny Smith یک باند در محدوده ۴۰۰ جفت بازی نشان داد که با نتایج حاصل از این تحقیق تطبیق داشت و مطالعه‌ای که توسط محمودی و همکاران (۲۰) در این ناحیه صورت گرفت، برای ارقام Golden Delicious، Granny Smith و Red Delicious یک باند در محدوده ۳۱۲ جفت بازی و برای Bud9 سه باند نشان داد که این گروه تحقیقی، باندی که در محدوده ۳۱۲ جفت بازی تشکیل شده بود را علت اصلی قرمز بودن میوه معرفی کرده بودند که این نتایج، با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت نداشت. از آنجایی‌که کنترل مثبت این تحقیق (گیاهانی که قبلا از نظر داشتن نوع آلل ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* بررسی شده‌اند)، نتایج قبلی را همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود تایید کردند، ژنوتیپ ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* در نمونه‌های برگی درختان سیب محلی ورزقان، میاندوآب، ماکامیک (خلعت پوشان) حاوی آلل R_1R_6 و نمونه کشت بافتی موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی حاوی آلل R_1R_1

می‌باشد. برای نمونه‌های برگی سیب محلی ایوند یکـی از آلـل‌هـا R_1 بود ولی آلل دیگری نیز مشاهده شد که در هیچ یک از مطالعات قبلی گزارش نشده است. بنابراین، رنگ قرمز گوشت در میوه درختان سیب مناطق میاندوآب، ورزقان و خلعت پوشان به وجـود آلـل R_6 در ناحیـه پروموتری ژن *MdMYB10* مرتبط اسـت، همـان‌طـور کـه آلـل R_6 *MdMYB10* علت رنگ قرمـز گوشـت در میـوه 'Red Field' (۶) و 'Maypole' (۲۹) است.

آلل S_3 مکان ژنی *S-RNase*

الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بـا آغازگرهـای اختصاصی آلل S_3-*RNase* (شکل ۴)، بـرای ژنوتیـپ‌هـای ماکامیـک (خلعت پوشان)، ورزقان، میانـدوآب، Golden Delicious، Granny Smith، Bud9 و نمونه کشت بافتی یک باند در محدوده ۵۰۰ جفـت بازی نشان داد و در نمونه‌های برگی درختان سیب محلی ایوند و رقم Red Delicious هـیچ بانـدی در محصـولات واکـنش زنجیـره‌ای پلی‌مراز مشاهده نشد.



شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR آلل S_3 مکان ژنی S-RNase بر روی ژل آگارز ۱٪. Ladder (O'GeneRuler™ 100 plus) (Fermentas)؛ ۱) Granny Smith (Fermentas) (کنترل مثبت)؛ ۲) Golden Delicious (کنترل مثبت)؛ ۳) ماکامیک (خلعت پوشان)؛ ۴) میاندوآب؛ ۵) ورزقان؛ ۶) Bud9؛ ۷) نمونه کشت بافتی؛ ۸) ایوند؛ ۹) Red Delicious (کنترل منفی)

Figure 4- Electrophoresis of polymerase chain reaction products on 1% agarose gel for S_3-*RNase* allele Ladder (O' Gene Ruler ™ 100 plus) (Fermentas). 1) Granny Smith (positive control), 2) Golden Delicious (positive control), 3) Makamik (Khalatpoushan), 4) Miandoab, 5) Varzeghan, 6) Bud9, 7) Tissue culture sample, 8) Ivand, 9) Red Delicious (negative control)

قبلا گزارش شده است که ژنوتیپ مکان ژنی *S-RNase* در ارقام Golden Delicious، Granny Smith و Red Delicious بـه ترتیب، S_2S_3، S_3S_{23} و S_9S_{19} می‌باشد (۱۵). به همین علـت، دو رقـم اول به عنوان کنترل مثبت و سومی بـه عنـوان کنتـرل منفـی بـرای حضور آلـل S_3 در ایـن آزمـایش وارد شـدند. همچنـین پـس از آنهـا، سکورای و همکاران (۲۳) ژنوتیپ مکان ژنـی *S* را در رقـم Golden Delicious با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مـراز، بررسـی کردند که همین نتیجه تایید شد. پژوهش حاضر نیز نشان داد که یکی از آلل‌های خودناسـازگاری در ارقـام Golden Delicious، Granny Smith، Bud9، سیب‌های محلی ورزقان، ماکامیک (خلعـت پوشـان)، میاندوآب و نمونه کشت بافتی از نوع S_3-*RNase* می‌باشـد. بنـابراین، نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج قبلـی مطـابق بـود. بـا توجـه بـه پیوستگی که بین صفت رنگ قرمـز گوشـت در میـوه 'Pink Pearl' (که حاوی آلل R_1 *MdMYB10*) با آلل S_3-*RNase* وجـود دارد (۲۸)، رنگ قرمز گوشت در نمونه کشت بافتی از یک ژنوتیـپ سـیب بـومی میاندوآب حاوی سیب گوشت قرمز، به وجود همـین آلـل نسـبت داده می‌شـود. همـین‌طـور رنـگ قرمـز گوشـت در میـوه نتـاج حاصـل از 'JPP35' × 'Shinano Sweet' و 'JPP35' × 'Orin' بـه وجـود آلـل S_3-*RNase* نسبت داده شد (۳۲).

جدول ۲- نوع آل‌های ناحیه پیشبری ژن MdMYB10 و S-RNase در نمونه‌های مورد استفاده در تحقیق

Table 2- Allelo-types of promoter region of *MdMYB10* gene and *S-RNase* locus of the samples used in this study.

Genotype ژنوتیپ / Locus مکان ژن	*In vitro* sample نمونه درون شیشه ای	Granny Smith گرانی اسمیت	Red Delicious رد دلیشز	Golden Delicious گلدن دلیشز	Bud9 باد۹	Miandoab میاندوآب	Varzighan ورزقان	Makamik (Khalatpoushan) خلعت پوشان	Ivand ایوند
MdMYB10 Promoter پیشبر ژن *MdMYB10*	R_1	R_1	R_1	R_1	R_1R_6	R_1R_6	R_1R_6	R_1R_6	R_1 $R_?$
S-RNase مکان ژنی *S-RNase*	S_3-*RNase*	S_3-*RNase*	S_9S_{19} (not seen)	S_3-*RNase*	S_3-*RNase*	S_3-*RNase*	S_3-*RNase*	S_3-*RNase*	not seen مشاهده نشد

احتمالا همه واریته‌های گوشت قرمز مورد آزمایش که دارای آلل R_6 در ناحیه پیشبری ژن *MdMYB10* خود بودند، از یک جد مشترک این آلل را به ارث برده اند که به احتمال زیاد *Malus pumila* var. Niedzwetzkyana بوده است. این در حالی است که در برخی از واریته‌ها یک مکان ژنی پیوسته با آلل S_3-*RNase* می‌تواند مسئول فنوتیپ قرمز گوشت میوه سیب باشد.

در تحقیق سکیدو و همکاران (۲۸) میوه های گوشت قرمز و سفید تواما مورد بررسی قرار گرفتند و پیوستگی بین آلل S_3 و قرمز بودن گوشت در 'Pink Pearl' تایید شد. در تحقیق حاضر نیز نمونه کشت بافتی که از یک درخت سیب با شاخ و برگ و میوه قرمز بدست آمده است، در ناحیه پیشبری R_1R_1 ولی در مکان ژنی *S-RNase* دارای آلل S_3 بود و احتمال داده می‌شود قرمز بودن آن در ارتباط با مکان ژنی پیوسته با S_3 باشد. تایید این امر نیازمتد مطالعات ژنتیکی بیشتری است. همچنین، با توجه به نبود آلل R_6 در سیب محلی ایوند و قرمز بودن شاخ و برگ آن، پیشنهاد می‌شود نوع آلل R و سایر ژن‌های درگیر در بیوسنتز آنتوسیانین در آن شناسایی و توالی‌یابی شود، هر چند که در این تحقیق، باند بسیار ضعیفی در محل باند S_3 مشاهده گردید و احتمال ارتباط رنگ آن با مکان ژنی پیوسته با S_3 نیز وجود دارد.

منابع

1. Allan A.C., Hellens R.P., and Laing W.A. 2008. MYB transcription factors that colour our fruit. Trends in Plant Science 13(3): 99-102.
2. Ban Y., Honda C., Hatsuyama Y., Igarashi M., Bessho H., and Moriguchi T. 2007. Isolation and functional analysis of a MYB transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. Plant and Cell Physiology 48(7): 958-970.
3. Broothaerts W. 2003. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles. Theoretical and Applied Genetics 106(4): 703-714.
4. Broothaerts W., Janssens G.A., Proost P., and Broekaert W.F. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. Plant Molecular Biology 27(3): 499-511.
5. Chagné D., Carlisle C.M., Blond C., Volz R.K., Whitworth C.J., Oraguzie N.C., Crowhurst R.N., Allan A.C., Espley R.V., and Hellens R.P. 2007. Mapping a candidate gene (MdMYB10) for red flesh and foliage colour in apple. BMC Genomics 8(1): 212.
6. Espley R.V., Brendolise C., Chagné D., Kutty-Amma S., Green S., Volz R., Putterill J., Schouten H.J., Gardiner S.E., and Hellens R.P. 2009. Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples. The Plant Cell 21(1): 168-183.
7. Espley R.V., Hellens R.P., Putterill J., Stevenson D.E., Kutty- Amma S., and Allan A.C. 2007. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor, MdMYB10. The Plant Journal 49(3): 414-427.
8. FARAGHER J.D. 1983. Temperature regulation of anthocyanin accumulation in apple skin. Journal of Experimental Botany 34(10): 1291-1298.
9. Forkmann G. 1991. Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. Plant Breeding 106(1): 1-26.
10. Frankel R., and Galun E. 2012. Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding. Vol. 2. Springer Science & Business Media.
11. Holton T.A., and Cornish E.C. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. The Plant Cell 7(7):

1071.
12. Honda C., Kotoda N., Wada M., Kondo S., Kobayashi S., Soejima J., Zhang Z., Tsuda T., and Moriguchi T. 2002. Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin. Plant Physiology and Biochemistry 40(11): 955-962.
13. Huang D.-J., Lin C.-D., Chen H.-J., and Lin Y.-H. 2004. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (Ipomoea batatas [L.] Lam 'Tainong 57') constituents. Bot. Bull. Acad. Sin. 45: 179-186.
14. Iversen C.K. 1999. Black currant nectar: effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. Journal of Food Science 64(1): 37-41.
15. Janssens G., Goderis I., Broekaert W., and Broothaerts W. 1995. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. Theoretical and Applied Genetics 91(4): 691-698.
16. Jin H., and Martin C. 1999. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. Plant Molecular Biology 41(5): 577-585.
17. Kobel F. 1939. Weitere Untersuchungen uber die Befruchtungsverhaltnisse der Apfelund Birnsorten. Landw. Jahrb. Schweiz 53: 160-191.
18. Lin-Wang K., Bolitho K., Grafton K., Kortstee A., Karunairetnam S., McGhie T.K., Espley R.V., Hellens R.P., and Allan A.C. 2010. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. BMC Plant Biology 10(1): 50.
19. Lodhi M.A., Ye G.-N., Weeden N.F., and Reisch B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars andVitis species. Plant Molecular Biology Reporter 12(1): 6-13.
20. Mahmoudi E., MOHAMMAD S.B., Yadollahi A., and Hosseini E. 2012. Independence of color intensity variation in red flesh apples from the number of repeat units in promoter region of the MdMYB10 gene as an allele to MdMYB1 and MdMYBA.
21. Martin C., and Paz-Ares J. 1997. MYB transcription factors in plants. Trends in Genetics 13(2): 67-73.
22. Mol J., Stuitje A., Gerats A., van der Krol A., and Jorgensen R. 1989. Saying it with genes: molecular flower breeding. Trends in Biotechnology 7(6): 148-153.
23. Sakurai K., Brown S.K., and Weeden N.F. 1997. Determining the self-incompatibility alleles of Japanese apple cultivars. HortScience 32(7): 1258-1259.
24. Sassa H., Hirano H., and Ikehashi H. 1992. Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). Plant and Cell Physiology 33(6): 811-814.
25. Sassa H., Hirano H., and Ikehashi H. 1993. Identification and characterization of stylar glycoproteins associated with self-incompatibility genes of Japanese pear, Pyrus serotina Rehd. Molecular and General Genetics MGG 241(1-2): 17-25.
26. Sassa H., Hirano H., Nishio T., and Koba T. 1997. Style- specific self- compatible mutation caused by deletion of the S- RNase gene in Japanese pear (*Pyrus serotina*). The Plant Journal 12(1): 223-227.
27. Schwinn K., Venail J., Shang Y., Mackay S., Alm V., Butelli E., Oyama R., Bailey P., Davies K., and Martin C. 2006. A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus Antirrhinum. The Plant Cell 18(4): 831-851.
28. Sekido K., Hayashi Y., Yamada K., Shiratake K., Matsumoto S., Maejima T., and Komatsu H. 2010a. Efficient breeding system for red-fleshed apple based on linkage with S3-RNase allele in 'Pink Pearl'. HortScience 45(4): 534-537.
29. Sekido K., Yamada K., Shiratake K., Fukui H., and Matsumoto S. 2010b. MdMYB alleles responsible for apple skin and flesh color. Current Topics in Plant Biology Volume 11. 17-21.
30. Siegelman H., and Hendricks S. 1958. Photocontrol of anthocyanin synthesis in apple skin. Plant Physiology 33(3): 185.
31. Takos A.M., Jaffé F.W., Jacob S.R., Bogs J., Robinson S.P., and Walker A.R. 2006. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. Plant Physiology 142(3): 1216-1232.
32. Umemura H., Shiratake K., Matsumoto S., Maejima T., and Komatsu H. 2011. Practical breeding of red-fleshed apple: cultivar combination for efficient red-fleshed progeny production. HortScience 46(8): 1098-1101.
33. van Nocker S., Berry G., Najdowski J., Michelutti R., Luffman M., Forsline P., Alsmairat N., Beaudry R., Nair M.G., and Ordidge M. 2012. Genetic diversity of red-fleshed apples (Malus). Euphytica 185(2): 281-293.
34. Walker A.R., Lee E., Bogs J., McDavid D.A., Thomas M.R., and Robinson S.P. 2007. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. The Plant Journal 49(5): 772-785.

Journal of Horticultural Science
Vol. 35, No.4, Winter 2022, P. 469-477
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰، ص. ۴۷۷-۴۶۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Allelotyping of *S-RNase* Gene and Promoter Region of *MdMYB10* Gene in some Genotypes of Apple (*Malus* spp.)

M. Vakili-Gartavol[1]- N. Mahna[2*]
Received: 05-12-2019
Accepted: 01-05-2021

Introduction: Red-fleshed apples (*Malus* spp.) are one of the rarest apple genotypes in the world and the accumulation of a high amount of anthocyanin, is the main cause of the redness of their fruit flesh. Anthocyanins are among important flavonoids and due to antioxidative activity, scavenge reactive oxygen species, and hence, are considered as one of the health-promoting nutraceuticals in the human diet. The amount of anthocyanins depends upon the expression of the transcription factors that are regulating their metabolic pathway. Among these transcription factors are the members of the *MYB* gene family. *MdMYB10*, belonging to this gene family in apple, has been shown to have a significant role in controlling the amount of anthocyanin production and redness in fruit flesh. The expression of *MdMYB10* and consequently, the production of MdMYB10 proteins has positive feedback on its own expression. This happens due to a 23 bp microsatellite tandemly repeated 5 times in its promoter region (called allele R_6) which is a target sequence for MdMYB10 acting as a positive regulator. This structure invokes the overexpression of *MdMYB10* which in turn increases the expression of anthocyanin producing enzymes and finally the amount of anthocyanin in all organs of the apple plant including fruit flesh. The apple *Malus pumila* var. Niedzwetzkyana and its derivatives have been reported to have such a structure in the promoter region of the *MdMYB10* gene. The length of the R_6 allele is 496 bp, while the R_1 allele is only 392 bp long.

However, in some cases, a locus linked to the S_3 allele of the *S-RNase* gene has been proposed to be responsible for the redness of the fruit flesh in some genotypes. It has been reported that even the offspring of these plants have had red-fleshed fruits.

Materials and Methods: To study the mechanism of the redness of the fruit flesh in some local genotypes, genomic DNA was extracted using the CTAB method from the leaf samples obtained from 9 red- and white-fleshed apple genotypes including Red Delicious, Golden Delicious, Miandoab, Makamik (Khalatpoushan), Bud 9, Varzighan, and Ivand. Then the allelotype of the promoter region of the *MdMYB10* gene as well as the existence of S_3 allele at *S-RNase* locus was investigated using polymerase chain reaction. For amplification of the target sequences, *MdMYB10* and S_3 specific primers were exploited and 1% agarose gel electrophoresis of the amplified fragments was used for observing and scoring the bands. All steps were repeated seven times.

Results and Discussion: The results in this research showed that the white-fleshed genotypes (Red Delicious, Golden Delicious, and Granny Smith) were lacking any R_6 allele at the promoter region of the *MdMYB10* gene and were R_1R_1 homozygotes, while the red-fleshed genotypes (Miandoab, Makamik (Khalatpoushan), Bud 9, and Varzighan) had at least one R_6 allele at the mentioned promoter region as well as a S_3 allele in the self-incompatibility locus *S-RNase*. These results were in accordance with the previous reports. Therefore, these samples could be traced back to *Malus pumila* var. Niedzwetzkyana. Evaluating the *S-RNase* locus in these genotypes illustrated that Granny Smith (as positive control), Golden Delicious (as positive control), Makamik (Khalatpoushan), Miandoab, Varzeghan, Bud 9 and tissue culture sample, showing a band around 500 bp (smaller) had S_3 allele, while for Ivand and Red Delicious (as negative control) no S_3 band was obtained. For the tissue culture sample which was R_1R_1 at the promoter region and S_3 at *S-RNase* locus, it was postulated that flesh-redness may be due to the locus linked to the S_3 allele. We also got an unknown *R* band for the Ivand genotype when analyzing for the *MdMYB10* promoter region. The sequencing of in the future studies, may help to unravel the mechanism by which shoot-redness happens in this genotype.

Conclusion: The development of highly potent and novel cultivars for the fast-evolving market is indispensable in the plant breeding field. In this way, breeding apple plant, as an important temperate fruit with a long postharvest life, for redness of fruit flesh can be considered as a noticeable case. We could confirm in this research that in the endemic, red-fleshed apples, R_6 may be responsible for their high anthocyanin production. However, the S_3-*RNase*-linked locus should also be considered in marker-assisted breeding methods for this trait.

1 and 2- Master of Science and Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mahna@tabrizu.ac.ir)
DOI: 10.22067/JHS.2021.60821.0

Therefore, these red-fleshed genotypes are highly recommended to be employed in the national breeding programs for increasing the anthocyanin content of apple fruits.

Keywords*:* Anthocyanin, *MdMYB10* gene promoter, Red-fleshed apples, *S-RNase*